DOI:10.11931/guihaia.gxzw201805022

广西沿海 4 种红树植物抗肿瘤活性的筛选1

谭德超[1,2]，罗花[1]，邓家刚[1,3]，郝二伟[1,3]，易湘茜[1,2,3]，冯小慧[1,2]，韦林垚[1,2]，
夏中尚[1,2]，徐炜杰[1,2]，谢金玲[1,3]，侯小涛[1,2,3*]

（1. 广西中医药大学 中药药效研究重点实验室，南宁 530200；2. 广西中医药大学 药学院，南宁 530200；
3. 广西中医药大学 农作物废弃物功能成分研究协同创新中心，南宁 530200）

摘要：采用超声提取法，得到红海榄(*Rhizophora stylosa*)叶、秋茄(*Kandelia candel*)的茎和叶、水黄皮(*Pongamia pinnata*)叶以及桐花树(*Aegiceras corniculatum*)茎的 95%乙醇提取物，采用 MTS 法检测提取物对前列腺癌 DU145、PC3 细胞增殖抑制效果。结果表明，桐花树茎 95%乙醇提取物对 DU145 细胞增殖抑制作用最强，对 DU145 干预 24、48 和 72 h 的 IC_{50} 分别为 75.23，88.81，76.53 μg • mL^{-1}。在此基础上，依次采用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇对桐花树茎 95%乙醇提取物进行梯度萃取，得到不同极性部位后选择桐花树茎乙酸乙酯部位（EACS）对 19 种肿瘤细胞（HT-29，SW480，DLD-1，COLO205，PC3，DU145，SKOV3-S，A2780，SGC-7901，Tca-8113，MDA-MB-231，HepG2，SMMC-7721，Bel-7402，MHCC-97H，Hela，PANC-1，EJ，A549）和 3 种正常细胞（HUVEC，EC304，RWPE-1）进行 MTS 实验检测其抗增殖作用，采用集落形成实验进一步检测 EACS 对细胞 HT-29、DLD-1、SW480、DU145、PC3、SKOV3-S 的增殖影响。结果表明，EACS 对 16 个肿瘤细胞和 3 个正常细胞均具有不同程度的增殖抑制作用，其中对 RWPE-1 的增殖抑制作用最强，药物作用 72 h 后的 IC_{50} 为 22.78 μg • mL^{-1}；EACS 对细胞 HT-29、DLD-1、SW480、DU145、PC3、SKOV3-S 的集落形成均具有抑制作用，抑制作用强度与浓度成正相关关系。该研究结果为以上 4 种红树植物的进一步开发利用提供了科学参考；同时初步确定桐花树具有显著的抗肿瘤活性，有望作为新的抗肿瘤药物进一步开发。

关键词：红树植物，抗肿瘤活性，筛选，MTS，集落形成

中图分类号：R932　　　　　　**文献标识码：A**

Screening antitumor activity of 4 mangrove plants in Guangxi coastal area

TAN Dechao[1,2], LUO Hua[1], DENG Jiagang[1,3], HAO Erwei[1,3], YI Xiangxi[1,2,3], FENG Xiaohui[1,2], WEI Linyao[1,2], XIA Zhongshang[1,2], XU Weijie[1,2], XIE Jinling[1,3], HOU Xiaotao[1,2,3 *]

（1. *Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530200, China；2. *Faculty of Pharmacy*, *Guangxi University of Chinese Medicine*,

---

基金项目：国家自然科学基金（21662006）；广西科技计划项目（桂科 AD17195025）；广西科学研究与技术开发计划项目（桂科合 15104001-11）；广西教育厅中药学优势学科建设专项课题重点课题（ZYXZ2015001）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (21662006); Guangxi Science and Technology Program (AD17195025); Guangxi Science and Technology Construction Planning (15104001-11); Key Program of Special Subject Construction of Chinese Materia Medica in Guangxi Education Department (ZYXZ2015001)]。

作者简介：谭德超（1992 - ），男，广西浦北人，硕士研究生，从事中药基础理论及中药药理学研究，(E-mail)dechaotan@foxmail.com。
***通信作者：**侯小涛，博士，教授，博士生导师，从事中药活性成分研究，(E-mail)xthou@126.com。

Nanning 530200, China；3. *Collaborative Innovation Center of Study on Functional Ingredients of Agricultural Residues, Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530200, China）

Abstract: The 95% ethanol extracts of the leaves of *Rhizophora stylosa*, stems and leaves of *Kandelia candel*, leaves of *Pongamia pinnata* and stems of *Aegiceras corniculatum* were extracted by ultrasonic extraction method. The cytotoxicity of 95% ethanol extracts from these 4 mangrove plants on prostate cancer cells DU145 and PC3 was tested by MTS assay. The results showed that the anti-proliferation on prostate cancer cell DU145 of 95% ethanol extract of *A. corniculatum* stems was the strongest among the tested samples with IC_{50} value of 75.23, 88.81 and 76.53 μg • mL^{-1} to DU145, respectively. On this basis, the ethanol extract of *A. corniculatum* stems was successively treated with petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol to yield 4 fractions , then the ethyl acetate fraction of *A. corniculatum* stems (EACS) was tested for anticancer activities against 19 tumor cells (HT-29, SW480, DLD-1, COLO205, PC3, DU145, SKOV3-S, A2780, SGC-7901, Tca-8113, MDA-MB-231, HepG2, SMMC-7721, Bel-7402, MHCC-97H, Hela, PANC-1, EJ, A549) and antiproliferative effects of 3 normal cells (HUVEC, EC304, RWPE-1) by MTS assay, the effect of EACS on proliferation of HT-29, DLD-1, SW480, DU145, PC3 and SKOV3-S cells was detected by the colony formation assay. The results showed that EACS exhibited different degrees of inhibitory effect on proliferation of 16 tumor cells and 3 normal cells, and had the stronger inhibitory effect on the proliferation of RWPE-1 with IC_{50} value of 22.78 μg • mL^{-1} after 72 hours of drug treatment . EACS inhibited the colony formation of HT-29, DLD-1, SW480, DU145, PC3 and SKOV3-S cells in a dose-dependent manner. The results provided a scientific reference for the further development and utilization of the above 4 mangrove plants. At the same time, it was initially determined that *A. corniculatum* has significant anti-tumor activity and is expected to be further developed as a new anti-tumor drug.

Key word: mangrove plants, antitumor activity, screening, MTS, colony formation

肿瘤是目前世界上发病率及致死率高的疾病之一。2012 年全球范围内肿瘤的新增病例约有 1 410 万，死亡病例有 820 万；欠发展国家的新增病例占据了 57%，死亡病例占据了 65%（Torre et al, 2015）。中国 2015 年的癌症新发病例达 429 万，死亡病例 281 万（Chen et al, 2016）；中国癌症发病占全球癌症发病的 21.8%，癌症死亡占全球的 26.9%，发病率处于世界癌症平均发病水平，但死亡率相对较高（高婷等，2016）。目前临床上治疗肿瘤的药物种类及数量较多，但多数药物均具有恶心、呕吐等的毒副作用而限制了其使用范围，因此寻找有效低毒的新型抗肿瘤药物是极为迫切的。

药物的传统来源是陆生植物或者微生物的天然产物，尤其是次生代谢产物，诸如阿司匹林、青霉素、吗啡的发现。在肿瘤领域的临床用药至少 60%是天然药物来源（Das et al, 2015），如多柔比星、紫杉醇。相对陆生植物资源的药用研究，海洋生态系统相当于药用研究领域的新大陆，且与陆地生态系统的显著差异，有望从丰富的资源中分离出化学结构多样的活性成分（Molinski et al, 2009）。红树植物生长于热带和亚热带沿海潮间带（Mercer & Hamilton, 1984），是海洋生态系统的重要组成部分。高盐、高温、潮湿、强风等的潮间带环境，迫使红树植物通过合成新颖的次代谢产物来保护自身（Scholander et al, 1962；Zhang et al, 2007）。环境的特殊性使得红树植物相对于其他陆生植物更易于产生一些结构新颖的生物活性成分，从中找到新药先导化合物的可能性极大。此外，红树植物在传统医学中应用广泛，可用于治疗肿瘤、糖尿病、麻风病、眼病、肝炎等众多病症（Bandaranayake, 1998）。基于生理特异性和传统医学应用，红树植物是值得应用现代医药研究技术进行深入研究的。

现代研究表明（Bandaranayake, 2002；Patra & Thatoi, 2011；杨维等, 2011），红树植物主要含有的化合物：脂肪族醇、氨基酸、多不饱和脂肪酸、萜类、黄酮类、生物碱类、醌类、木脂素类、甾醇类、鞣质、杂环化合物等，并具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗高血压、抗炎、抗氧化、虫鱼毒性等的生物活性。近年来，红树植物的抗肿瘤研究证明其具有广泛的抗肿瘤

活性，并从中分离出众多具有抗肿瘤活性的成分（Das et al, 2015），如桐花树果甲醇提取物对 VERO、NIH3T3、AGS、HT-29、MCF-7、MDA-MB-231 具有较强的细胞毒性，IC_{50} 在 0.000 5~0.998 mg • mL^{-1} 之间（Akter et al，2014），并有学者从桐花树中分离出具有抗肿瘤活性的 aegicoroside A、sakurasosaponin、sakurasos-aponin methyl ester（Vinh et al，2017）、5-氧-乙基信筒子醌、5-氧-甲基信筒子醌（徐岷涓等，2008）和 Embelin 及其衍生物（Thota et al，2016；李勇，2010）。还有学者从木果楝(*Xylocarpus granatum*)中分离出具有抗肿瘤活性的 Xylogranatin A、Xylogranatin B、Xylogranatin C、Xylogranatin D（Yin et al，2006）等。但根据文献报道，目前对于桐花树抗肿瘤作用的系统研究偏少，对其抗肿瘤作用的机理及活性成分研究仍有待深入。

总的来说，红树植物仍是一类资源丰富但药物开发研究相对较少的物种（Kathiresan et al., 2006；Harshad, 2016），应当在现有的研究基础上开展更深入的研究，以期从中分离出更多具有生物活性的天然化合物及开发出优于当前临床治疗肿瘤的药物。本研究对广西沿海的 4 种红树植物进行细胞毒性检测来评价它们对前列腺癌细胞 DU145、PC3 的增殖抑制作用，并进一步选择作用较强的桐花树进行体外抗肿瘤活性评价。

1. 材料与方法

1.1 材料、试剂、耗材与仪器

4 种红树植物：红海榄（109°40'03.3"E ，21°32'11.8"N）、水黄皮（109°39'58.4"E ，21°32'04.9"N）、秋茄（109°40'05.2"E ，21°32'14.3"N）于 2016 年 7 月采自广西北海市合浦县山口国家级红树林生态自然保护区，桐花树（108°03'49.7"E ，21°32'06.7"N）于 2016 年 7 月采自广西防城港市北仑河口红树林保护区。由广西中医药大学的韦松基教授分别鉴定为红海榄(*Rhizophora stylosa*)的成熟叶及嫩叶、水黄皮(*Pongamia pinnata*)的成熟叶及嫩叶、秋茄 (*Kandelia candel*)的茎和叶（成熟叶及嫩叶）、桐花树(*Aegiceras corniculatum*)的茎，干燥标本保存于广西中医药大学中药药效研究重点研究室。

细胞系：人结直肠癌细胞 HT-29，SW480，DLD-1，COLO205; 人前列腺癌细胞 PC3，DU145; 人卵巢癌细胞 SKOV3-S，A2780; 人胃癌细胞 SGC-7901; 人舌癌细胞 Tca-8113; 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231; 人肝癌细胞 HepG2，SMMC-7721，Bel-7402，MHCC-97H; 人宫颈癌细胞 Hela; 人胰腺癌细胞 PANC-1; 人膀胱癌细胞 EJ; 人非小细胞肺癌细胞 A549; 人脐静脉内皮细胞 HUVEC; 人血管内皮细胞 EC304; 人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1。

试剂：95%乙醇（批号：2016070601，厂家：成都科龙化工试剂厂）、乙酸乙酯（批号：2016090601，厂家：成都科龙化工试剂厂）、正丁醇（批号：2016092201，厂家：成都科龙化工试剂厂）、石油醚（批号：2016060101，厂家：成都科龙化工试剂厂）、水溶性甲臜盐 MTS（批号：219904，厂家：Promega）、培养基 RPMI 1640（批号：350006026，厂家：WISENT）、DMEM（批号：20170315，厂家：江苏凯基）、 L15（批号：161109，厂家：江苏凯基）、 McCoY’s 5A（批号：20170407，厂家：江苏凯基）、 MEM（批号：161227，厂家：江苏凯基）、F12K（批号：319085020，厂家：WISENT）、胎牛血清 FBS（批号：1739463，厂家：Gibco）、青霉素/链霉素双抗溶液（批号：1864844，Gibco）、胰酶 0.25% Trypsin-EDTA（批号：1859509，厂家：Gibco）、平衡盐溶液 D-PBS（批号：311425016，厂家：WISENT）,DMSO（批号：1029B033，厂家：Solarbio）。

耗材：96 孔板（批号：3599，厂家：Corning）,5 mL 移液管（批号：4487，厂家：Corning）,10 mL 移液管（批号：4488，厂家：Corning）,15 mL 离心管（批号：430791，厂家：Corning）,50 mL 离心管（批号：430829，厂家：Corning）。

仪器：显微镜（型号：ECLIPSE TS100-F，厂家：Nikon），生物安全柜（型号：1389，厂家：Thermo），酶标仪（型号：Multiskan，厂家：Thermo），扫描仪（型号：9000F，厂家 Canon）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞分别接种在含有 10% 胎牛血清、100 U·mL^{-1} 的青霉素、100 μg·mL^{-1} 链霉素的相应培养基中，于 37 ℃，5% CO_2 恒温孵箱中培养。不完全培养基及相应的细胞系依次为：RPMI 1640 (PC3, DU145, Bel-7402, DLD-1, EJ, SGC-7901, SMMC-7721, Tca-8113, COLO205, EC304)、DMEM (A2780, PANC-1, HUVEC, MHCC-97H)、L15 (MDA-MB-231, SW480)、McCoY’s 5A (HT-29, SKOV3-S)、MEM (HepG2, Hela)、Keratinocyte-SFM (RWPE)和 F12K (A549)。

1.2.2 样品的制备

将红树植物晒干，分拣茎、叶，粉碎后分别用 95%乙醇超声提取 1 h，滤过后使用冷冻真空旋转蒸发仪回收乙醇（温度低于 60 ℃），浓缩至无醇味，60 ℃水浴干燥即得 95%乙醇提取物。

桐花树茎的 95%乙醇提取液在浓缩至无醇味后，依次进行石油醚、乙酸乙酯、正丁醇的萃取，萃取物浓缩干燥得桐花树茎不同极性部位。

取以上的 95%乙醇提取物和桐花树茎乙酸乙酯部位（EACS）进行肿瘤细胞的细胞毒性筛选。将提取物溶解于 DMSO 中，配成 100 mg·mL^{-1} 的储备液，提取物不易溶解时，置于超声仪超声溶解，并用 0.22 μm 过滤筛过滤后分装于 EP 管，保存于-20 ℃。

1.2.3 体外肿瘤细胞增殖抑制实验（MTS 法）

将对数生长期的细胞种植在 96 孔板中，每孔 2 000 个细胞，每组设置 3 个复孔，置于 37 ℃，5% CO_2 恒温孵箱中过夜贴壁后给药。95%乙醇提取物给药梯度各不同，EACS 设 5 个给药梯度组（50.0，75.0，100.0，150.0，200 μg·mL^{-1}），每组给药组分别设置相应的药物颜色扣除孔，以及培养液对照组、DMSO 对照组，设置 3 块板，分别进行 24、48、72 h 的检测。给药后置于 37 ℃，5% CO_2 恒温孵箱中进行常规培养。

分别在培养 24、48、72 h 后，每孔加入 20 μL 完全融化后的 Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent，然后将细胞放回培养箱中继续培养 2 h，于酶标仪上在 490 nm 波光处处读取吸光度值。细胞活力（%）=药物干预组/对照组×100%。用 GraphPad 5 线性图，并用 SPSS 21 检验统计分析，计算 IC_{50}。

1.2.4 集落形成实验

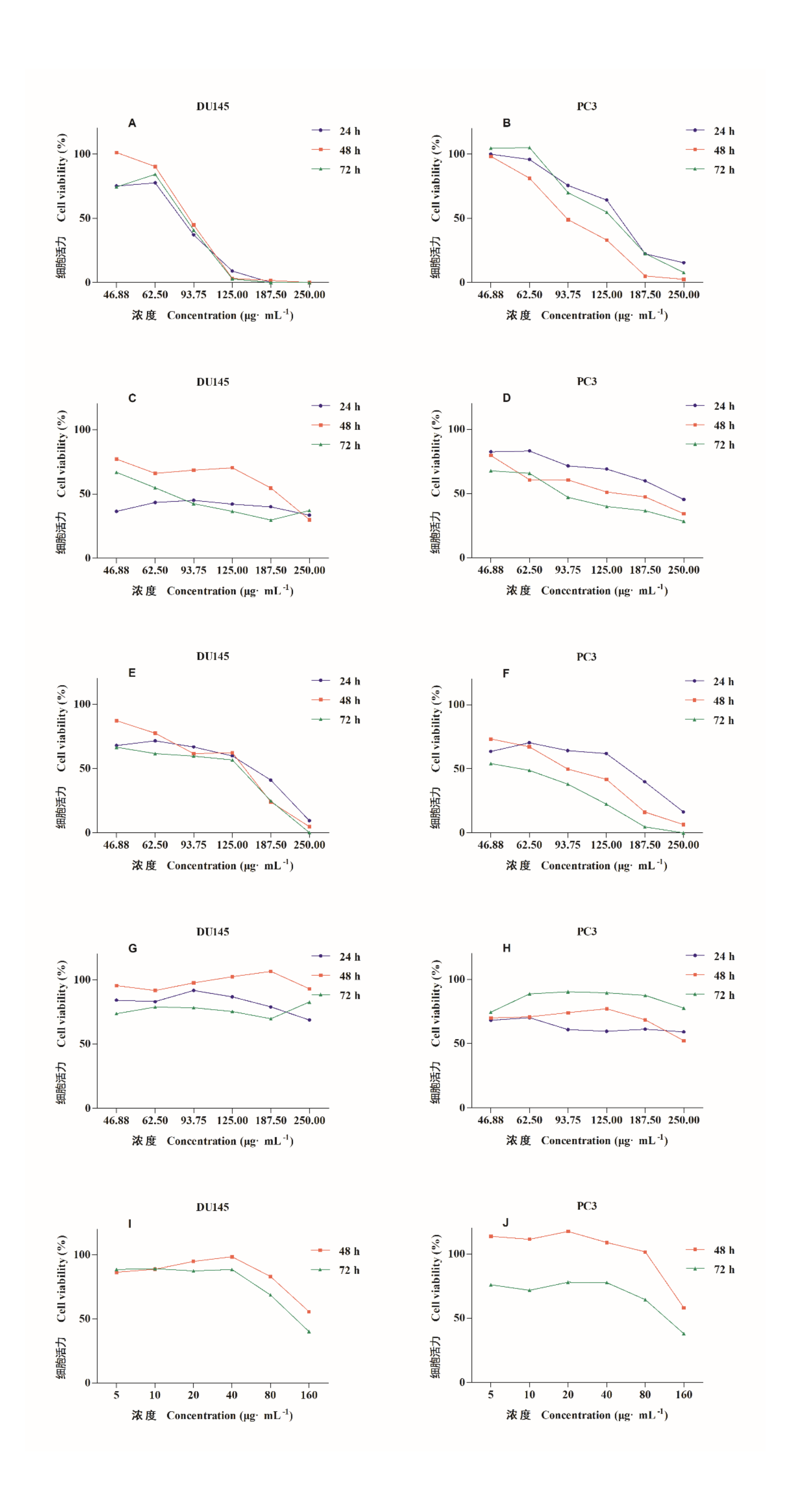
将以每个孔 400 个细胞的密度均匀地铺于 6 孔板中，24 h 之后给予药物 EACS（12.5, 25 μg·mL^{-1}）干预，并设置对照组。4 天后换一次液，新的液体分别为完全培养基、相同浓度的药物组，8 天后终止克隆形成。将 6 孔板从培养箱中取出并吸走液体，用 D-PBS 缓冲液清洗两遍后用 4%的多聚甲醛固定 20 min，吸走 4%多聚甲醛后用结晶紫染色液染色 18 min。吸走结晶紫并用 D-PBS 清洗干净，将 6 孔板用扫描仪扫描。克隆形成率=克隆形成数/种板细胞数×100%。

2.结果

2.1 4 种广西沿海红树植物对人前列腺癌细胞 DU145、PC3 的抑制作用

细胞增殖实验表明，除了红海榄，秋茄、桐花树、水黄皮的 95%乙醇提取物对人前列腺癌 DU145、PC3 增殖均表现出一定的抑制作用，且抑制作用随着药物浓度的增加而增强，呈量效关系。秋茄茎 95%乙醇提取物对 DU145、PC3 细胞增殖抑制效果在作用了 72 h 时最强，IC_{50} 分别为 81.48，97.77 μg • mL^{-1}；秋茄叶 95%乙醇提取物抑制 DU145、PC3 细胞的增殖也是在 72 h 时最强，IC_{50} 分别为 93.21，59.75 μg • mL^{-1}。桐花树茎 95%乙醇提取物对 DU145 细胞增殖抑制作用在 24 h 时最强，IC_{50} 为 75.23 μg • mL^{-1}；而对 PC3 细胞增殖抑制作用则是在 48 h 时最强，IC_{50} 为 97.13 μg • mL^{-1}。水黄皮叶 95%乙醇提取物对 DU145、PC3 细胞增殖抑制作用均在 72 h 时最强，IC_{50} 分别为 170.57，184.82 μg • mL^{-1}。

在药物干预了 48、72 h 时，均是桐花树茎 95%乙醇提取物对 DU145 细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 最小，表明其对 DU145 细胞增殖抑制作用最强。


DU145
A
PC3
B
DU145
C
PC3
D
DU145
E
PC3
F
DU145
G
PC3
H
DU145
I
PC3
J
24 h
48 h
72 h
细胞活力 Cell viability (%)
浓度 Concentration (μg· mL-1)
46.88
62.50
93.75
125.00
187.50
250.00
5
10
20
40
80
160
0
50
100

注：数值是一式三份的平均值，以误差线表示标准偏差。下同。**A, B**. 桐花树茎 95%乙醇提取物；**C, D**. 秋茄茎 95%乙醇提取物；**E, F**. 秋茄叶 95%乙醇提取物；**G, H**. 红海榄叶 95%乙醇提取物；**I, J**. 水黄皮叶 95%乙醇提取物。

Note: Data were the average of triplicates, error bars represented SD. The same below. **A**, **B**. 95% EtOH extract of *Aegiceras corniculatum* (stems); **C**, **D**. 95% EtOH extract of *Kandelia candel* (stems); **E**, **F**. 95% EtOH extract of *Kandelia candel* (leaves); **G**, **H**. 95% EtOH extract of *Rhizophora stylosa* (leaves); **I**, **J**. 95% EtOH extract of *Pongamia pinnata* (leaves).

图 1　4 种红树植物 95%乙醇提取物对前列腺癌细胞 DU145 和 PC3 的增殖抑制作用

Fig.1 Inhibition of 95% ethanol extracts of 4 mangrove plants on proliferation of DU145 and PC3 cells ($\bar{x}\pm s$，n=3）

表 1　4 种红树植物 95%乙醇提取物作用于 DU145 和 PC3 细胞的 IC_{50}

Table 1 IC_{50} values of 95% ethanol extracts of 4mangrove plants against DU145 and PC3

红树植物 Mangrove plant	组织 Tissue	干预时间 Intervention time (h)	DU145 (μg・mL^{-1})	PC3 (μg・mL^{-1})
桐花树 *Aegiceras corniculatum*	茎 Stem	24	75.23	140.75
		48	88.81	97.13
		72	76.53	126.77
秋茄 *Kandelia candel*	茎 Stem	24	—	240.98
		48	178.44	139.54
		72	81.48	97.77
	叶 Leaf	24	118.37	120.01
		48	116.04	88.65
		72	93.21	59.75
红海榄 *Rhizophora stylosa*	叶 Leaf	24	1 966.89	839.60
		48	—	1 016.89
		72	—	—
水黄皮 *Pongamia pinnata*	叶 Leaf	48	745.91	219.37
		72	170.57	184.82

注：—表示无明显细胞毒性。

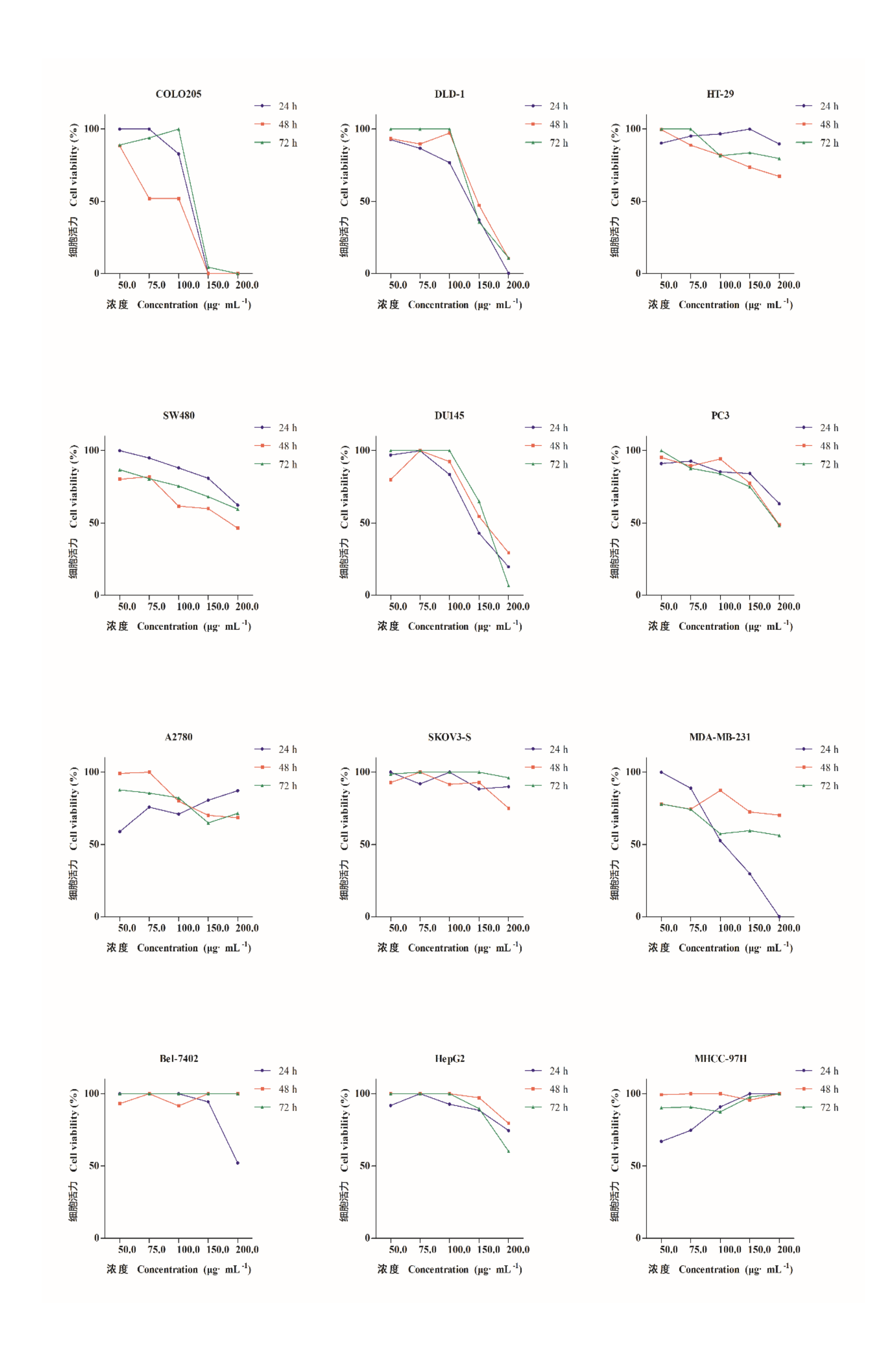
Note: —indicate no obvious cytotoxicity.

2.2 EACS 对 19 种人肿瘤细胞和 3 种人正常细胞的抑制作用

EACS 对 19 种人肿瘤细胞和 3 种人正常细胞中的细胞增殖实验结果表明，EACS 在药液浓度 50 ~ 200 μg • mL^{-1} 的范围内对人肝癌细胞 MHCC-97H、SMMC-7721 和人非小细胞肺癌细胞 A549 无明显细胞毒性，而对其他 16 种肿瘤细胞和 3 个正常细胞均具有不同程度的增殖抑制效果，抑制作用随着浓度的增加而增强，呈量效关系。结果见图 2 和表 2。

以药物作用 48 和 72 h 的 IC_{50} 为参照，在 16 个肿瘤细胞中，EACS 对结直肠癌 COLO205 细胞增殖抑制作用最强，IC_{50} 分别为 83.51、117.03 μg • mL^{-1}; 其次是结直肠癌 DLD-1 细胞，细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 分别为 142.45、146.28 μg • mL^{-1}。EACS 对 3 个正常细胞的增殖也具有抑制作用，对 HUVEC、EC304、RWPE-1 细胞增殖抑制作用依次增强；在 EACS 干预 48、72 h 时，RWPE-1 细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 分别为 87.64、22.78 μg • mL^{-1}。由此可见，EACS 对细胞增殖抑制作用不具有选择特异性，不能区分肿瘤细胞与正常细胞。若进一步对 EACS 进行分离，得到的细胞增殖抑制作用活性成分，可考虑化学结构修饰，以期从中得到具有选择特异性的抗肿瘤活性成分。

EACS 干预 DU145 细胞，在 24、48 和 72 h 时，细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 分别是 144.36、166.02 和 158.64 μg·mL^{-1}；EACS 干预 PC3 细胞，在 24、48 和 72 h 时，抑制增殖的 IC_{50} 分别是 357.51、219.81 和 203.81 μg·mL^{-1}。以上 6 个值均比桐花树茎 95%乙醇提取物对 DU145、PC3 细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 大，说明桐花树茎 95%乙醇提取物的对前列腺癌 DU145、PC3 细胞增殖抑制作用的活性成分不富集在 EACS 上，而在石油萃取物或者正丁醇萃取物中。


COLO205
DLD-1
HT-29
SW480
DU145
PC3
A2780
SKOV3-S
MDA-MB-231
Bel-7402
HepG2
MHCC-97H
24 h
48 h
72 h
细胞活力 Cell viability (%)
浓度 Concentration (μg· mL^{-1})
50.0 75.0 100.0 150.0 200.0
0
50
100

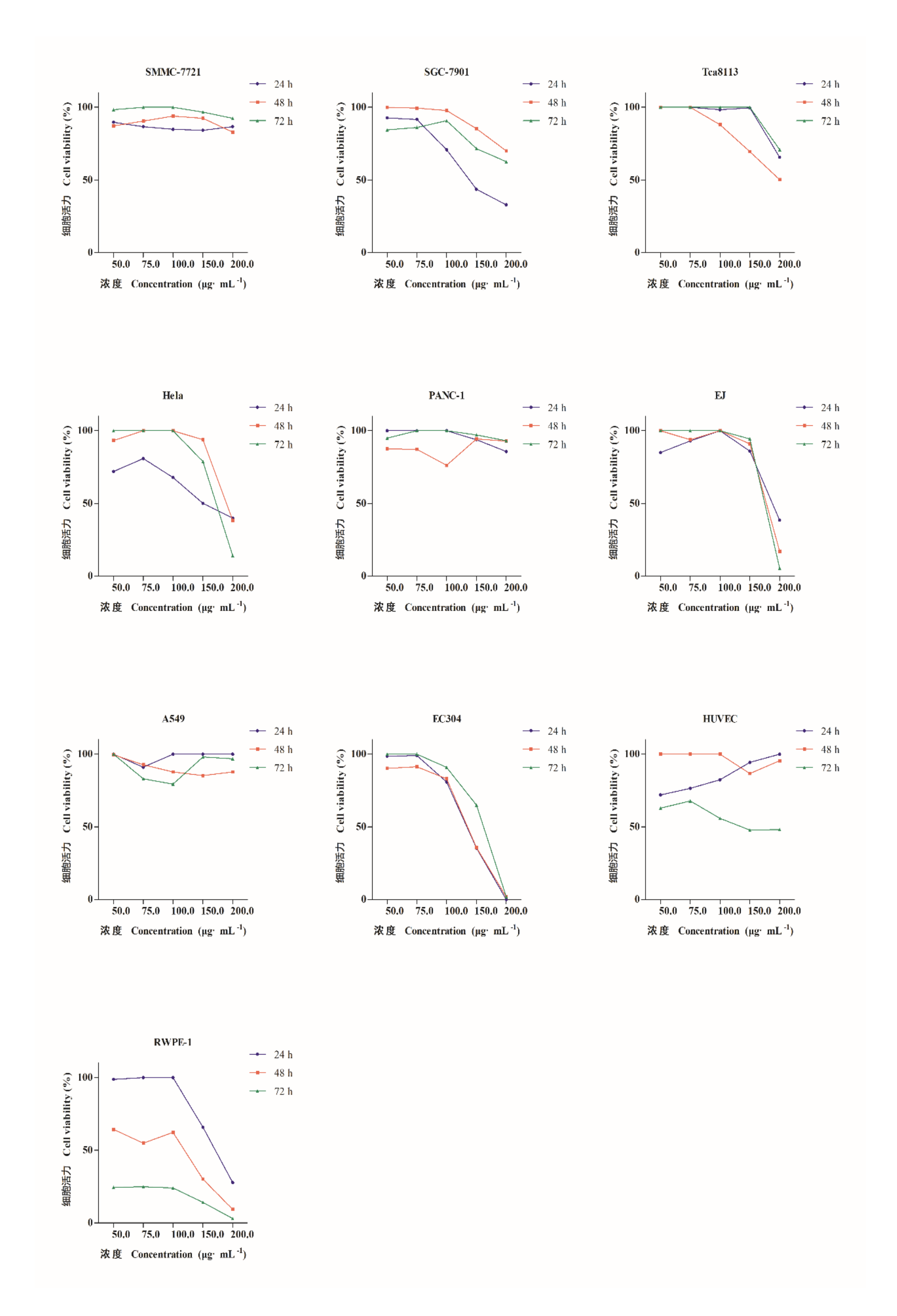


图 2　EACS 对 19 种肿瘤细胞和 3 种人正常细胞的增殖抑制作用

Fig.2 Inhibitions of EACS on proliferation of 19 human tumor cells and 3 normal cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

表 2　EACS 作用于 19 种人肿瘤细胞和 3 种人正常细胞的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} values of EACS against 19 human tumor cells and 3 normal cells

细胞类型 Cell type	细胞系 Cell line	24 h (μg • mL^{-1})	48 h (μg • mL^{-1})	72 h (μg • mL^{-1})
	桐花树茎乙酸乙酯部位（EACS） *Aegiceras corniculatum* stems ethyl acetate fraction			
人结直肠癌细胞 Human colorectal cancer cell	COLO205	111.80	83.51	117.03
	DLD-1	120.65	142.45	146.28
	HT-29	—	271.99	353.00
	SW480	243.45	186.91	297.46
人前列腺癌细胞 Human prostate cancer cell	DU145	144.36	166.02	158.64
	PC3	357.51	219.81	203.81
人卵巢癌细胞 Human ovarian cancer cell	A2780	—	243.66	420.15
	SKOV3-S	818.50	515.70	—
人乳腺癌细胞 Human breast cancer cell	MDA-MB-231	110.82	—	241.98
人肝癌细胞 Human liver cancer cell	Bel-7402	201.59	—	—
	HepG2	482.29	346.28	211.12
	MHCC-97H	—	—	—
	SMMC-7721	—	—	—
人胃癌细胞 Human gastric cancer cell	SGC-7901	145.66	241.14	381.83
人舌癌细胞 Human tongue cancer cell	Tca-8113	244.14	193.44	257.99
人宫颈癌细胞 Human cervical cancer cell	Hela	159.77	205.96	169.49
人胰腺癌细胞 Human pancreatic cancer cell	PANC-1	378.41	—	—

人膀胱癌细胞 Human bladder cancer cell	EJ	231.33	175.72	171.95
人肺癌细胞 Human lung cancer cell	A549	—	—	—
人血管内皮细胞 Human vascular endothelial cell	EC304	129.09	124.52	151.50
人脐静脉内皮细胞 Human umbilical vein endothelial cell	HUVEC	—	726.49	161.95
人正常前列腺上皮细胞 Normal human prostate epithelial cell	RWPE-1	170.63	87.64	22.78

注：— 表示无明显细胞毒性。

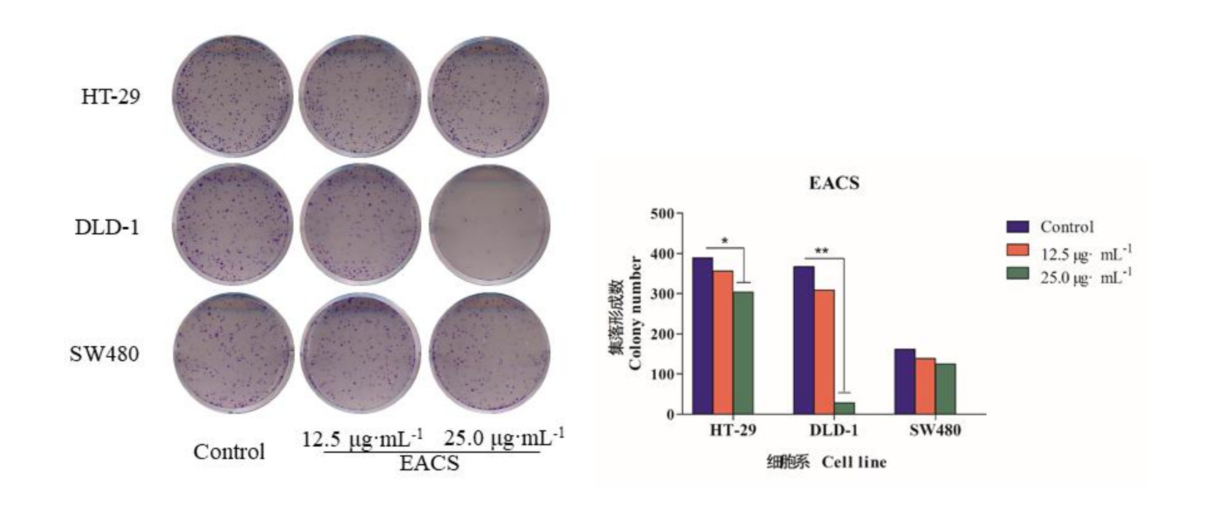
Note: — indicate no obvious cytotoxicity.

2.3 EACS 对 HT-29、DLD-1、SW480、DU145、PC3 细胞集落形成的影响

EACS 对人结肠癌细胞 HT-29、DLD-1、SW480 的集落形成干预效果见图 3，对人前列腺癌细胞 DU145、PC3 及人卵巢癌细胞 SKOV3-S 的集落形成干预效果见图 4。

通过克隆形成实验，进一步证实了 EACS 对细胞 HT-29、DLD-1、SW480、DU145、PC3、SKOV3-S 的增殖抑制作用。如图 3、4 所示，EACS 对这 6 种细胞的克隆形成的抑制作用强度与浓度成正相关关系，药物浓度越高，抑制作用越强。在与对照组比较的情况下，EACS 对 SW480 的克隆形成无明显的抑制效果，而对其他的 5 种细胞的克隆形成的抑制效果较强，均具有统计学意义。

在 12.5 μg • mL^{-1} 的 EACS 干预下，DU145 细胞克隆形成数与空白对照组比较，差异具有极显著意义（$P < 0.01$）；而 DLD-1、PC3、SKOV3-S 细胞克隆形成数与对照组比较，差异在浓度为 25.0 μg • mL^{-1} 时才具有极显著意义（$P < 0.01$）。在 25.0 μg • mL^{-1} EACS 干预下，HT-29 细胞克隆形成数与对照组比较，差异具有显著意义（$P < 0.05$）。



注：* 表示 $P < 0.05$，** 表示 $P < 0.01$。下同。

Note: * means $P < 0.05$，** means $P < 0.01$. The same below.

图 3　EACS 对人结肠癌细胞 HT-29、DLD-1、SW480 集落形成的影响

Fig.3 Effects of EACS on colony-forming of HT-29, DLD-1 and SW480 cells

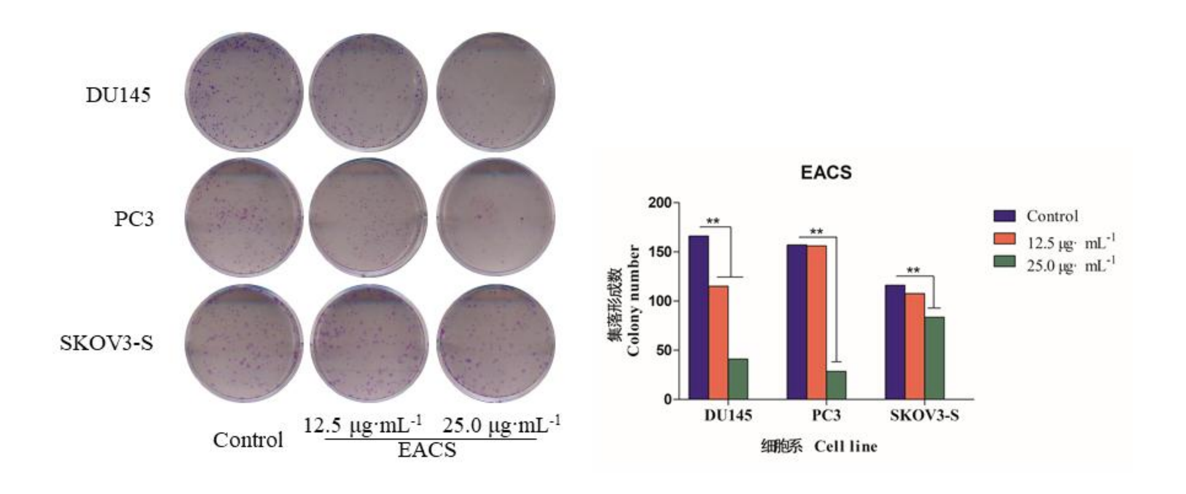


图 4　EACS 对人前列腺癌细胞 DU145、PC3 及人卵巢癌细胞 SKOV3-S 的集落形成的影响

Fig.4 Effects of EACS on colony-forming of DU145, PC3 and SKOV3-S cells

3.讨论

恶性肿瘤是目前世界上仅次于心血管疾病的第二大致死疾病。尽管现在有许多可应用于治疗恶性肿瘤的药物，但是这些药物往往会产生副作用。红树植物历来被人们用来治疗各种疾病，其中就包括治疗肿瘤。红树林植物生长于陆地与海洋的交界处，环境的特殊性使得红树植物易于产生新颖的次代谢产物。目前为止，研究者发现多种红树植物具有抗肿瘤作用，并从中分离出了多种具有抗肿瘤活性的化学成分（韦林垚等, 2018）。

红树植物的提取物或者从中分离出来的活性成分，它们的抗肿瘤机理各不相同，主要有阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制细胞转移和侵袭、抑制肿瘤血管生成等。桐花树中分离出的抗肿瘤活性成分 5-氧-乙基信筒子醌和 5-氧-甲基信筒子醌阻断肿瘤细胞周期在 G0/G1 期，并诱导肿瘤细胞凋亡来抗肿瘤（徐岷涓等，2008）；红海榄中分离出的环木菠萝苷可激活肿瘤细胞的 Caspase-3 和 Capase7，从而诱导细胞凋亡（Huong et al., 2014）；从白骨壤中分离出来的 naphtho[1,2-b]sdfghijufuran-4,5-dione 通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 MDA-MB-231 细胞的转移和侵袭（Hsieh et al., 2013）；小花老鼠簕的提取物可抑制 VEGF 的表达，从而抑制肿瘤血管生成（Mahasiripanth et al., 2012）。通过文献检索发现，多种红树植物具有抗肿瘤活性，并且机理多种多样。此外，红树植物的抗肿瘤活性具有一定肿瘤选择性，如红海榄叶中提取出来的环木菠萝苷对扁平上皮癌 KB 细胞、肺腺癌 LU-1 细胞、黑色素瘤 SK-Mel-2 细胞均具有显著的细胞毒性作用（Huong et al., 2014），但在本研究中，红海榄叶 95%乙醇提取物对前列腺癌 DU145、PC3 细胞无明显细胞毒性。同一种红树植物对不同肿瘤细胞增殖抑制作用不同，提示对同一红树植物提取物或者从中分离出来的抗肿瘤活性成分进行扩大

肿瘤细胞系筛选是很有必要的。同时，要对筛选出的抗肿瘤活性成分进行进一步的抗肿瘤机理研究。

本研究中，通过对红海榄、秋茄、水黄皮、桐花树不同部位的 95%乙醇提取物抗肿瘤活性的筛选，发现桐花树茎 95%乙醇提取物对 DU145 细胞增殖抑制作用最强。红海榄叶 95%乙醇提取物对前列腺癌 DU145、PC3 细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 大于 800 μg·mL^{-1}，推断其对前列腺癌 DU145、PC3 细胞不具有抗肿瘤活性。进一步对桐花树茎 95%乙醇提取物进行分离，并选择了乙酸乙酯萃取物进行多种肿瘤细胞的抗肿瘤活性筛选，结果表明 EACS 对多种肿瘤细胞具有一定增殖抑制作用，但具有一定的选择性，对 MHCC-97H、SMMC-7721、A549 细胞增殖无明显抑制作用。EACS 对 DU145、PC3 细胞增殖抑制作用比桐花树茎 95%乙醇提取物小，表明在石油醚或者正丁醇萃取物中具有抗肿瘤作用更强的活性成分，应进一步研究桐花树茎石油醚、正丁醇萃取物的抗肿瘤活性。MTS 实验中，EACS 在 48、72 h 的干预下对结肠癌 COLO205 细胞增殖抑制作用最强，但因 COLO205 是半悬浮细胞，不利于进行集落形成实验，所以在集落形成实验中选择了细胞增殖抑制作用仅次于 COLO205 的 DLD-1 细胞及其同一肿瘤系的 HT-29 和 SW480；此外还选择了乙醇提取物初筛抗肿瘤活性的前列腺癌 DU145、PC3 细胞。

通过对红海榄、秋茄、水黄皮、桐花树等广西 4 种红树植物抗肿瘤活性进行筛选研究，发现秋茄、水黄皮、桐花树均具有不同程度的抗肿瘤活性，其中桐花树的抗肿瘤活性最强。桐花树乙醇提取物的细胞增殖实验（MTS）和 EACS 的细胞增殖实验及集落形成实验，说明桐花树具有显著的抗肿瘤活性，并为进一步明确桐花树的抗肿瘤活性部位，从中发现活性成分提供了基础数据。后期可以该抗肿瘤活性筛选实验为指导，针对性研究具有抗肿瘤活性红树植物的化学成分，以期发现结构新颖、疗效显著的天然抗肿瘤药物。

参考文献

AKTER R, UDDIN SJ, GRICE ID, et al, 2014. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts [J]. J Nat Med, 68(1): 246-252.

BANDARANAYAKE WM, 1998. Traditional and medicinal uses of mangroves [J]. Mang Salt Mar, 2(3): 133-148.

BANDARANAYAKE WM, 2002. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants [J]. Wetlands Ecol Manage, 10(6): 421-452.

CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al, 2016. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 66(2): 115-132.

DAS G, GOUDA S, MOHANTA YK, et al, 2015. Mangrove plants: A potential source for anticancer drugs [J]. Indian J Geo-Mar Sci, 44(5): 666-672.

GAO T, LI C, LIANG X, et al, 2016. International comparison of cancer incidence and mortality in China [J]. Chin Cancer, 25(6): 409-414. [高婷, 李超, 梁锌, 等, 2016. 中国癌症流行的国际比较 [J]. 中国肿瘤, 25(6): 409-414.]

HARSHAD M, 2016. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology [J]. J Pharm BioAllied Sci, 8(2): 83-91.

HSIEH CY, TSAI PC, TSENG CH, et al, 2013. Inhibition of EGF/EGFR activation with naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione blocks migration and invasion of MDA-MB-231 cells [J]. Toxicol in Vitro, 27(1): 1-10.

HUONG PT, DIEP CN, THANH NV, et al, 2014. A new cycloartane glucoside from Rhizophora stylosa [J]. Nat Prod Commun, 9(9): 1255–1257.

KATHIRESAN K, BOOPATHY NS, KAVITHA S, 2006. Coastal vegetation - an underexplored source of anticancer drugs [J]. Nat Prod Rad, 5(2): 115-119.

LI Y, 2010. Studies on chemical constutuents of mangrove plant *Aegiceras corniculatum* [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University. [李勇, 2010. 红树植物桐花树 *Aegiceras corniculatum* 化学成分研究 [D]. 太原: 山西医科大学.]

MAHASIRIPANTH T, HOKPUTSA S, NIRUTHISARD S, et al, 2012. Effects of Acanthus ebracteatus Vahl on tumor angiogenesis and on tumor growth in nude mice implanted with cervical cancer [J]. Cancer Manage Res, 4: 269-279.

MERCER DE, HAMILTON LS, 1984. Mangrove ecosystems: some economic and natural benefits [J]. Nat Resourc, 20(2): 14-19.

MOLINSKI TF, DALISAY DS, LIEVENS SL, et al, 2009. Drug development from marine natural products [J]. Nat Rev Drug Disc, 8(1): 69-85.

PATRA JK, THATOI HN, 2011. Metabolic diversity and bioactivity screening of mangrove plants: a review [J]. Acta Physiol Plant, 33(4): 1051-1061.

SCHOLANDER PF, HAMMEL HT, HEMMINGSEN E, et al, 1962. Salt Balance in Mangroves [J]. Plant Physiol, 37(6): 722-729.

THOTA SPR, SARMA NS, MURTHY YLN, et al, 2016. A new embelin from the mangrove *Aegiceras corniculatum* [J]. Indian J Chem, 55(1): 123-127.

TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al, 2015. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 65(2): 87-108.

Vinh LB, Nguyet NTM, Yang SY, et al, 2017. Cytotoxic triterpene saponins from the mangrove *Aegiceras corniculatum* [J]. Nat Prod Res, Nov 16, 1-7.

WEI LY, HOU XT, HAO EW, et al, 2018. Research progress on anticancer effects and mechanism of medicinal mangrove plants [J]. Chin J Mar Drugs, 37(03): 93-100. [韦林垚, 侯小涛, 郝二伟, 等, 2018. 药用红树植物抗肿瘤药理作用及其机制的研究进展 [J]. 中国海洋药物, 37(03): 93-100.]

XU MJ, LI M, LIN WH, 2008. Studies on bioactive secondary metabolites from the mangrove plant *Aegiceras corniculatum* and an endophytic fungus *Penicillium* sp. [A]. The 9th National Youth Pharmacologists latest scientific research symposium of Chinese Pharmaceutical Association [C]. Beijing: Chinese Pharmaceutical Association: 436-438. [徐岷涓, 李 敏, 林文翰, 2008. 海洋红树植物桐花树及其内生真菌次生代谢产物的化学和生物活性研究 [A]. 中国药学会第九届全国青年药学工作者最新科研成果交流会论文集 [C]. 北京: 中国药学会: 436-438.]

YANG W, XIA XZ, HAN WD, et al, 2011. Study on the Chemical Constitutes and Biological Activity of Mangrove Plants [J]. Food Res Dev, 32(1): 173-180. [杨维, 夏杏洲, 韩维栋, 等, 2011. 红树植物的化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 食品研究与开发, 32(1): 173-180.]

YIN S, FAN CQ, WANG XN, et al, 2006. Xylogranatins A-D: novel tetranortriterpenoids with an unusual 9,10-*seco* scaffold from marine mangrove *Xylocarpus granatum* [J]. Org Lett, 8(21): 4935-4938.

ZHANG FQ, WANG YS, LOU ZP, et al, 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*) [J]. Chemosphere, 67(1): 44-50.